

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-304951

(43)Date of publication of application : 19.11.1993

(51)Int.Cl.

C12N 5/00

(21)Application number : 04-083867

(71)Applicant : N T SCI:KK

(22)Date of filing : 06.04.1992

(72)Inventor : TAKAHASHI YUMI
TAKAHASHI AKIO
MATSUMOTO KAZUYA
MIYATA KENJI

(54) CULTURE SOLUTION FOR EARLY EMBRYO AND EMBRYONIC STEM CELL

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a culture solution intended for culture of the undifferentiated cells in nonlimiting animal species and/or strains, esp. animal embryos, to establish ES cells (strains) and/or EC cells (strains) derived from the animal embryos and improve the efficiency of such establishment, and for growth promotion and the stabilization of the culture maintenance.

CONSTITUTION: ES cells (strains) and/or EC cells (strains) in animal species and/or strains, having been hard to establish, can be established by culture of cells derived from undifferentiated cells, esp. animal embryos and the cells derived therefrom using a culture solution containing insulin-like growth factor type II (and leukemia inhibitory factor). Furthermore, even in the animal species and/or strains where ES cells (strains) and/or EC cells (strains) have been established, the efficiency of such establishment can be improved and their culture maintenance stabilized by using a similar culture solution.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of

rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-304951

(43)公開日 平成5年(1993)11月19日

(51)Int.Cl.⁵

C12N 5/00

識別記号

庁内整理番号

E 7236-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数12(全 9 頁)

(21)出願番号 特願平4-83867

(22)出願日 平成4年(1992)4月6日

(71)出願人 591052309

株式会社エヌティーサイエンス

東京都青梅市新町2221番地の1

(72)発明者 高橋 由美

東京都八王子市泉町1279-16

(72)発明者 高橋 明男

山梨県甲府市飯田3-4-24

(72)発明者 松本 和也

神奈川県川崎市多摩区中野島4-3-31

東ソー登戸社宅203号

(72)発明者 宮田 堅司

神奈川県横浜市緑区つつじが丘2番2号

東ソー社宅204号

(74)代理人 弁理士 岸田 正行 (外3名)

(54)【発明の名称】 初期胚及び胚性幹細胞の培養液

(57)【要約】

【目的】 限定されない動物種及び／又は系統における未分化細胞特に動物胚の培養ならびに動物胚に由来するES細胞(株)及び／又はEC細胞(株)の樹立、樹立効率の向上、増殖促進及び培養維持の安定化を図るための培養液を提供する。

【構成】 インシュリン様成長因子II型、もしくはインシュリン様成長因子II型及び白血病抑制因子を含む培養液で未分化細胞特に動物胚及び動物胚に由来する細胞を培養することで、現在までにES細胞(株)及びEC細胞(株)の樹立が困難であった動物種及び／又は系統におけるES細胞(株)及びEC細胞(株)の樹立を可能とする。また、既にES細胞(株)及びEC細胞(株)が樹立されている動物種及び／又は系統においても、同様の培養液を用いることによりES細胞(株)及びEC細胞(株)樹立効率の向上及び培養維持の安定化を図る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 多能性及び／又は全能性分化能を持つ未分化細胞に対して分化抑制及び／又は増殖促進効果を有するインシュリン様成長因子II型。

【請求項2】 請求項1において、未分化細胞である動物胚に対して分化抑制及び／又は増殖促進効果を有するインシュリン様成長因子II型。

【請求項3】 請求項1において、動物胚に由来する未分化細胞に対して分化抑制及び／又は増殖促進効果を有するインシュリン様成長因子II型。

【請求項4】 請求項3において、動物胚に由来する細胞が胚性奇形腫細胞（株）である、未分化細胞に対して分化抑制及び／又は増殖促進効果を有するインシュリン様成長因子II型。

【請求項5】 請求項3において、動物胚に由来する細胞が胚性幹細胞（株）である、未分化細胞に対して分化抑制及び／又は増殖促進効果を有するインシュリン様成長因子II型。

【請求項6】 請求項1ないし5のいずれかのインシュリン様成長因子II型、又はこれに加えて白血病抑制因子を有効成分として含有することを特徴とする試験管内培養において動物胚より胚性奇形腫細胞を樹立するために用いる培養液。

【請求項7】 請求項1ないし5のいずれかのインシュリン様成長因子II型、又はこれに加えて白血病抑制因子を有効成分として含有することを特徴とする試験管内培養において動物胚より胚性幹細胞を樹立するために用いる培養液。

【請求項8】 請求項1ないし5のいずれかのインシュリン様成長因子II型、又はこれに加えて白血病抑制因子を有効成分として含有することを特徴とする試験管内培養において胚性胚性奇形腫細胞を増殖及び／または維持するために用いる培養液。

【請求項9】 請求項1ないし5のいずれかのインシュリン様成長因子II型、又はこれに加えて白血病抑制因子を有効成分として含有することを特徴とする試験管内培養において胚性幹細胞を増殖及び／または維持するために用いる培養液。

【請求項10】 請求項6ないし9のいずれかにおいて、インシュリン様成長因子II型及び／又は白血病抑制因子が天然型であることを特徴とする培養液。

【請求項11】 請求項6ないし9のいずれかにおいて、インシュリン様成長因子II型及び／又は白血病抑制因子が組換え型であることを特徴とする培養液。

【請求項12】 請求項6ないし11のいずれかにおいて、インシュリン様成長因子II型または白血病抑制因子がその活性を有するアミノ酸配列の全長を含むかもしくはその活性を有する断片長ペプチドを含むことを特徴とする培養液。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、未分化細胞特に動物胚の培養並びに動物胚に由来する胚性幹細胞（株）及び／又は胚性奇形腫細胞（株）の樹立及び胚性幹細胞（株）の増殖・維持を行うために使用される培養液に関するものである。

【0002】

【発明の背景と従来技術】 近年、発生工学並びに分子生物学における知識の蓄積と技術の発展に伴い、人為的に調製された外来遺伝子を初期胚に導入し、さらに個体に発生させるトランスジェニック動物（以下TG動物）の作製が可能となった（Gordon, J. W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:7380-7384, 1980）。このようなTG動物の作製は、遺伝子工学的手法でクローン化された遺伝子を実際に生体内において発現させることにより、導入された遺伝子の機能・作用を個体レベルで検討する以外に、疾病モデルTG動物や有用物質産生TG動物が開発されるにおよび医学分野及び産業分野においてもTG動物の有用性が認識されつつある。

【0003】 TG動物の作製方法としては、前核期胚に外来遺伝子断片を極微ピペットで直接注入するマイクロインジェクション法、外来遺伝子を組込んだレトロウィルスを初期胚に感染させるレトロウィルス法等が確立されている。しかしこれらの方法ではいずれも宿主染色体に対し外来遺伝子がランダムに組込まれるため、外来遺伝子の組込み部位を制御することは不可能である。このため再現性や外来遺伝子の効率的な発現等に問題を残している。

【0004】 一方、発生工学上の新たな分野として、各種個体形成組織への分化能を保持しながら未分化状態のまま試験管内で培養可能な株化細胞、すなわち胚性奇形腫細胞（Embryonal carcinoma cell; EC細胞）並びに胚性幹細胞（Embryonic stem cell; ES細胞）が樹立された。ES/EC細胞は正常初期胚に移植することにより、初期胚由来の細胞とES/EC細胞由来細胞が混在したまま一つの個体すなわちキメラ動物を形成することが確認された（Brinster, R. L., J. Exp. Med., 140:1949-1956, 1974）。またこのようなキメラ動物のうち精巣や卵巣の生殖細胞にES/EC細胞由来細胞が導入された動物は生殖系列キメラと呼ばれ、この動物を親として交配を継続することでES/EC細胞由来の細胞のみで構成される子孫を得ることができる。このことは遺伝学的に十分制御された人為的素質を持つ動物を獲得できるということであり、試験管内に限らず個体レベルにおいても発生や分化のメカニズムの検討を可能にした。

【0005】 EC細胞の研究は奇形腫（teratoma）並びに悪性奇形腫（teratocarcinoma）

a) の組織学的解析が発端となった。奇形腫はその腫瘍組織内に特定の固有組織又は固有細胞に分化した形態を示す構造が認められることから、正常細胞が腫瘍化しつつも一定の分化能を保持していると考えられ、また悪性奇形腫では同様な腫瘍組織中に増殖力が旺盛で未分化な幹細胞を含んでいることが観察された。これらの考察から、悪性奇形腫由来の幹細胞を分離することで、分化能を有したまま無限増殖可能な株化細胞樹立の可能性が示唆された。その後、正常胚盤胞を腎臓被膜下や精巣に移植することで人為的に奇形腫を作製できることが報告され (Stevens L. C., *Develop. Biol.*, 21:364-382, 1970)、その後腎臓被膜下で人為的に発生させた奇形腫細胞をさらに試験管内で培養することにより多系統の EC 細胞が樹立された (Silver, L. M. et al, *Teratocarcinoma Stem Cells*, Cold Spring Harbor Lab., N. Y., USA., 1983)。しかし、EC 細胞を用いたキメラ動物の作製において、キメラ形成率や生殖系列への寄与の低さ、キメラ個体での EC 細胞に由来すると推察される腫瘍の発生などが指摘され (Papaioannou, V. E. et al, *J. Embryol. Exp. Morph.*, 44:93-104, 1978)、現在その原因は EC 細胞が本来腫瘍由来であるために染色体異常やなんらかの遺伝子制御機能の異常が存在するためであると考えられている。

【0006】ES 細胞は EC 細胞とは異なり正常胚盤胞を直接試験管内培養することにより樹立された (Evance M. J. & Kaufman K. H., *NATURE* 292:7634-7638, 1981)。ES 細胞は、形態的にも、また、試験管内及び生体内における振る舞い方も EC 細胞に酷似している。しかし EC 細胞が本来腫瘍細胞であるのと比較し ES 細胞はその多くが正常二倍体の核型を保持した正常細胞であり、キメラ形成率、生殖系列への寄与ともに高率であることが明らかになっており (Bredley A. et al, *NATURE* 309:255-256, 1986)、そのため発生学分野以外にも ES 細胞の利用範囲は広がりつつある。

【0007】ES/EC 細胞に対しては他の株化細胞と同様に従来法を用いて外来遺伝子を導入することができ、また外来遺伝子導入細胞の集団の中から後述するように相同組換え体のみを選別できるようになったことで、マイクロインジェクション法等とは異なる TG 動物作製における特徴を確立した。

【0008】従来法による外来遺伝子の細胞への導入では外来遺伝子は宿主染色体上のランダムな位置に組み込まれるが、ある一定の確率で外来遺伝子と相同な宿主染色体上の内在性遺伝子との間で相同組換えと呼ばれる染色体変異を起こすことが知られている。すなわち目的とす

る内在性遺伝子と相同な配列部位を持つ外来遺伝子を導入すれば、ランダムな組換え体と同時に、標的とした内在性遺伝子配列に対して相同組換えを起こした相同組換え体をも生じさせることが可能である。またこのような相同組換え体を選別するために考案された外来遺伝子を導入することにより全組換え細胞集団より相同組換え体のみを選別し、最終的に宿主染色体上の任意の遺伝子を標的として変異を組み込んだ相同組換え細胞クローンを獲得することができる (Mansour, S. L. et al, *NATURE*, 336:348-352, 1988)。このような方法は導入遺伝子の構造や相同組換え体の選抜方法などにより数種考案されているが (Capocchi, M. R., *TIG*, 5:70-76, 1989)、一般にジーンターゲティングと総称されている。ジーンターゲティングの方法を相同組換え ES/EC 細胞の選抜に応用することで、マイクロインジェクション法など従来の TG 動物作製方法では不可能であった、任意の位置に外来遺伝子を挿入した相同組換え TG 動物作製の可能性が示された。現在、キメラ動物を介した TG 動物作製のための ES/EC 細胞に対する期待が高まっている。

【0009】従来法による ES 細胞 (株) の樹立においては支持細胞層として胎仔線維芽細胞を使用し、以下の過程により行われる。まず支持細胞層上で初期胚特に胚盤胞もしくは着床遅延胚盤胞を培養することで初期胚が支持細胞層に定着した後、胚外周の栄養芽細胞の伸展成長が始まる。さらに初期胚内部に存在する内部細胞塊 (Inner cell mass: ICM) が伸展した栄養芽細胞上でドーム状に増殖を開始、十分に ICM が増殖した時点で ICM のみを分離・分散して新たな支持細胞層上に継代する。継代された ICM 由来細胞の内、未分化形態を維持したまま増殖を続けるものがごくわずかに出現するようになる。この未分化細胞をさらに継代・増殖していくことで ES 細胞 (株) が樹立される (Robertson, E. J., *Teratocarcinomas and embryonic stem cells*, pp71-112, Robertson, E. J. ed., IRL Press Lim., Oxford., 1987)。

【0010】ES 細胞株を樹立、維持、増殖するための培養液としては DME 培養液を基礎培養液とし、これに非必須アミノ酸混合液・核酸混合液・メルカプトエタノール・新生児牛血清及び/又は牛胎児血清を加えたものが利用されている (Doetschman, T. C., *J. Embryol. exp. Morph.*, 87:27-45, 1985)。またマウス ES/EC 細胞 (株) を樹立・維持するさいに EC 細胞培養上清 (Martin, G. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:7634-7638, 1981) またはバッファローラット肝臓細胞培養上清 (BR

L-CM)を一定量上記培養液に添加することで分化抑制及び増殖が同時に促進されることが報告され (Smith, A. G. & Hooper, M. L., *Dev. Biol.*, 121:1-9, 1987)、これらの培養上清に含まれる活性は分化抑制因子 (differentiation-inhibiting activity: DIA) と呼ばれた。さらにその後 DIA は白血病抑制因子 (leukemia inhibiting factor: LIF) という一種のサイトカインであることが判明した (Williams, R. L. et al., *NATURE*, 336:684-687, 1988)。LIF は特定のマウスの系統においては LIF 無添加の場合に比較して ES 細胞 (株) の樹立効率を向上させ、また既に樹立されている ES/EC 細胞 (株) に対しても分化抑制活性及び増殖促進活性を示す (Pease, S. et al., *Dev. Biol.*, 144:344-352, 1990)。しかし他のマウスの系統や他種動物においては顕著な効果は見られない。このため現在に至る研究においても LIF 添加、無添加に関わらず従来の培養液による ES 細胞 (株) の樹立は 129/sv 系 (Handyside, A. et al., *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 198:48-56, 1989)、C57BL/6 系 (Doetschman, T. C. et al., *J. Embryol. Exp. Morph.*, 87:27-45, 1985) といったマウスの特定系統におけるものが主であり、他種動物では ES 様細胞として牛 (Schellander, K. et al., *Theriogenology*, 31:15-17, 1989)、豚 (Strojek, R. M. et al., *Theriogenology*, 33:901-914, 1990)、羊 (Handyside, A., *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 196:185-190, 1987)、ハムスター (Doetschman, T. et al., *Dev. Biol.*, 127:224-227, 1988) におけるごくわずかな報告があるだけである。さらに、同一動物種かつ同一系統で樹立された ES/EC 細胞 (株) であっても、異なる ES/EC 細胞クローン間では外来遺伝子の導入効率、導入遺伝子の発現効率、キメラ動物形成能及びキメラ動物における ES 細胞由来細胞の組織分布、特に生殖系列への ES 細胞由来細胞の導入効率に相違があるということが報告されており、同一系統であっても多くの ES/EC 細胞クローンを樹立しておく必要がある。このような現状から、動物種/系統を問わず樹立効率が高く、維持・増殖を容易にする培養液の開発が待たれている。インシュリン様成長因子 (insulin-like growth factor: IGF) は、最初、ヒト血清中において抗インシュリン抗体により抑制されないインシュリン様作用を示す物質として報告され (Froesch, E. R. et

al., *J. Clin. Invest.*, 42:1816, 1963)、non-suppressible insulin-like activity soluble (NSILA-S) と呼ばれた。さらに、NSILA-S は I と II に純化され、そのアミノ酸配列も確定された (Rinderknecht, E. & Humbel, R. E., *J. Biol. Chem.*, 253:2769, 1978)。その後、確定されたアミノ酸配列がインシュリンに類似であること、インシュリン様作用がみられることなどから、NSILA-S は、IGF-I、IGF-II と改名されている。さらに、IGF はその立体構造においてもインシュリンと類似しているため、同じようにアミノ酸配列、立体構造がインシュリンと類似しているリラキシンとともにインシュリン・ファミリーとして分類されている。ヒトの場合 IGF-II は酸性のポリペプチドで 67 個のアミノ酸より構成され、IGF-I と約 60% の相同性を持つ分子量約 7000 のペプチドである。また、IGF-II 遺伝子は第 11 染色体の短腕に局在しインシュリン遺伝子に近接していることが明らかになっており (Brissonden, J. E. et al., *NATURE*, 310:781-784, 1984, Tricoli, J. V. et al., *NATURE*, 310:784-786, 1984)、その cDNA は 180 個からなる前駆体プレプロ IGF-II をコードしていることから、IGF-II もインシュリンと同様にプレプロペプチド・ホルモンとして生合成され、プロセッシングを受けることにより最終的に IGF-II が生成されることが報告されている (Bell, G. I. et al., *NATURE*, 310:775-777, 1984)。

【0011】IGF-I についてはインシュリン様作用以外にも生体内において成長ホルモンの持つ成長促進作用を仲介していることが実証されており (Schoenle, E. et al., *NATURE*, 296:252, 1982)、また、試験管内においても各種動物の軟骨細胞の増殖、DNA/RNA 合成、タンパク合成、プロテオグリカン/コラーゲン合成、グリコゲン合成を促進することが報告されている (Zapf, J. et al., *Eur. J. Biochem.*, 87:285, 1978)。さらに、アガロースゲル内での軟骨細胞コロニー形成の刺激作用 (Lindahl, A. et al., *Endocrinology*, 121:1061-1069, 1987)、骨芽細胞の増殖促進・コラーゲン合成の促進作用も示すが、骨芽細胞の分化指標のひとつであるアルカリフォスファターゼ活性を誘導する作用も持つことが報告されている (Zapf, J. et al., *Clin. Endocrinol. Metab.*, 13:3, 1984)。このように作用が解明されている IGF-I に対し、IGF-II には生体内での明確な作用が認められないため、その生理学的意義は未

だ不明である。ラットでは胎児期に血清中 IGF-II 濃度が高値を示し、出生後に次第に減少することから、胎児期の主要な成長因子は IGF-II であると考えられている。また、試験管内では IGF-I とほぼ同様な作用を示すが、IGF-I と比較してその活性は低い。しかし、IGF-II は培養細胞に対しては明確な増殖促進作用を有しているため (Rechler, M. M. & Nissley, S. P., *Annu. Rev. Physiol.*, 47: 425-442, 1985)、その作用は主に培養細胞を用いて調べられてきた。IGF-II に応答性の細胞は線維芽細胞や血球系細胞が多い。また、褐色細胞腫で NGF 様作用がみられることは神経芽細胞での神経突起伸長作用の報告や脳脊髄液中に見いだされる IGF-II の主要な産生部位が脈絡叢と考えられることと共に、脳神経系における IGF-II の作用をも示唆している。

【0012】一方、IGF 受容体に関する研究の進展に伴い、インシュリンと IGF-I の受容体が $\alpha_2 \beta_2$ のサブユニット構造からなる四量体であり、また細胞内ドメインにチロシンキナーゼ活性部位が存在する類似構造を持つことが明かとなった。しかし、IGF-II 受容体 (以下 IGF-II R) は上記受容体とはまったく異なる構造を持つことが解明されている。すなわち IGF-II R は分子量 220~270 K のサブユニット構造を持たない単一タンパク質の受容体で、細胞内ドメインも短くチロシンキナーゼ活性部位も存在しない。IGF-II R 細胞内ドメインに細胞内伝達機構に関連するような酵素活性が認められないことで、一時期 IGF-II R は IGF-II と結合はするが情報の伝達には関与しておらず、IGF-II で認められる作用は全てインシュリン及び IGF-I 受容体への交差結合によるものであると考えられていた。その後、IGF-II R が IGF-II 及びマンノース-6-リン酸 (Man-6-P) 両者に対する結合部位を持ち、さらに IGF-II に対しては細胞内ドメインが GTP 結合 G 蛋白質との共役により Ca^{2+} チャンネルを活性化することが示された。また、 Ca^{2+} チャンネルを IGF-II 以外の他の物質で活性化することによっても細胞の増殖が刺激されることから、IGF-II の増殖刺激作用は最終的に細胞外 Ca^{2+} の細胞内への流入によって引き起こされることが実験的に証明された (Nishimoto, I., *J. Biol. Chem.*, 262: 12120-12126, 1987/西本育夫、蛋白質核酸酵素; 臨時増刊、細胞増殖因子の基礎と臨床、pp 52-60、清水信義、高久史磨編、共立出版、1991)

【0013】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、限定されない動物種及び/又は系統における未分化細胞特に動物胚の培養並びに動物胚に由来する ES 細胞 (株) 及び/又は EC 細胞 (株) の樹立、樹立効率の向上、増殖

促進及び培養維持の安定化を図るために使用される培養液に関するものである。

【0014】

【課題を解決する手段及び作用】本発明者は上記の目的を達成するために特許請求の範囲の各請求項に記載の発明を完成した。

【0015】本発明における IGF-II はいかなる動物種由来のものでよく、また自然界に存在する材料より精製・抽出される天然型、遺伝子工学的に生産される組換え型いずれでもよい。またラット IGF-II とも呼ばれる multiplication-stimulating activity (MSA) (Moses A. C. et al, *Eur. J. Biochem.*, 103: 387, 1980) のようなヒト以外の動物種における IGF-II の相同物質 (homologue) でもよい。さらに IGF-II の基本構造及び/又はアミノ酸配列を基礎とするいかなる部分ペプチド、変異体及び修飾体をも使用することができる。

【0016】本発明における培養液は ES/EC 細胞 (株) の樹立及び ES/EC 細胞 (株) の維持・増殖のために IGF-II もしくは IGF-II 及び LIF を含むことを特徴とする。該培養液の基礎培養液は既知の組成からなるどのような培養液の選択も可能である。例えば 199, NTCT135, CMRL1066, BME, MEM, DME, MB752/1, 5A, RITC80-7, F-10, F-12, L-15, MCD B104 等の各種培養液及びその変法による培養液があげられ、好ましくは高グルコース含有培養液、さらに好ましくは非必須アミノ酸混合液 (NEAA)・核酸混合液 (NMS)・メルカプトエタノール・セレン化合物・副腎皮質ホルモン及びその化合物・トランスフェリン・インシュリンの内から選ばれる添加物を添加した高グルコース含有培養液を用いる。このような培養液にさらに新生児牛血清 (NCS) 及び/又は牛胎児血清 (FCS) を 1~50%、好ましくは 5~30% 添加する。IGF-II は 1~1000000 ng/ml、好ましくは 5~1000 ng/ml、さらに好ましくは 10~200 ng/ml の濃度で使用され、LIF を使用する場合には 1~1000000 unit/ml、好ましくは 100~100000 unit/ml、さらに好ましくは 1000~10000 unit/ml の濃度が用いられる。

【0017】本発明によれば、該培養液を使用する動物胚及び動物胚に由来する細胞 (株) の培養は既知のいかなる培養方法をも用いることができる。また現在までに ES/EC 細胞 (株) が樹立されていない動物種及び/又は系統においても ES/EC 細胞 (株) の樹立が可能となる。また既に ES/EC 細胞 (株) が樹立されている動物種及び/又は系統においても新規な ES/EC 細胞 (株) 樹立効率の向上、培養維持の安定化及び増殖の促進を図ることができる。このようにして多種多様な E

S/EC細胞(株)及びES/EC細胞クローンを容易に提供できるような培養液の開発は、ES/EC細胞を用いたキメラ動物の作製及びキメラ動物を介するTG動物の作製を大きく進展させることが期待される。

【0018】

【発明の効果】本発明によれば、従来特定の動物種及び／又は系統のみに限定されていた未分化細胞特に動物胚の培養並びに動物胚に由来するES/EC細胞(株)の樹立が、多種多様な動物種及び／又は系統において可能となり、また既にES/EC細胞(株)が樹立されている動物種及び／又は系統においても新規なES/EC細胞(株)樹立効率の向上並びに培養維持の安定化及び増殖の促進を図ることができるようになるという効果がある。

【0019】

【実施例】以下に実施例を示す。但し、以下の実施例

表1：核酸混合液の組成

核酸	重量/純水100ml
アデノシン (Adenosine)	80mg
グアノシン (Guanosine)	85mg
シチジン (Cytidine)	73mg
ウリジン (Uridine)	73mg
チミジン (Thymidine)	24mg

【0022】

表2：ESM/NR1の組成

物質名	添加量/培養液100ml	最終濃度
DME	76.5ml	—
FCS	20.0ml	20.0 v/v %
NEAA	1.0ml	1.0 v/v %
NMS	1.0ml	1.0 v/v %
nrIGF-II	1.0ml	100 ng/ml
rmLIF	0.5ml	5000unit/ml

【0023】

は、上記の特許の請求範囲を制限するものではない。

【0020】実施例1：

初期胚及び／又はES細胞培養液の調製

高グルコース含有DME培養液(DME; GIBCO, 320-1965PJ)を基礎培養液とし、これに表1に示す組成の核酸混合液(NMS)、非必須アミノ酸溶液(NEAA; SIGMA, M7145)、牛胎児血清(FCS; CCT)、組換えマウスLIF(rmLIF; 和光純薬)をそれぞれ表2及び表3に示す量・濃度で加えて調製した。なお培養液に添加される天然型ラットIGF-II(nrIGF-II; SIGMA, I-2639)濃度によって、100ng/mlとしたESM/NR1(表2)並びに50ng/mlとしたESM/NR2(表3)に示す二種類の培養液を調製した。

【0021】

表1

【表2】

【表3】

表3: ESM/NR2の組成

物質名	添加量/培養液 100ml	最終濃度
DME	77.0ml	—
FCS	20.0ml	20.0 v/v %
NEAA	1.0ml	1.0 v/v %
NMS	1.0ml	1.0 v/v %
nrIGF - II	0.5ml	50 ng/ml
rmLIF	0.5ml	5000unit/ml

【0024】実施例2:

支持細胞層の調製

Wistar系ラットとACI系ラットを交配して得られる妊娠15日胎仔を摘出、試験管内で細切し、さらにトリプシン-EDTA処理により消化・分散した後、10%牛新生児血清(NCS; GIBCO)添加DME培養液に浮遊させた。次に細胞浮遊液をプラスチックディッシュに分注し、37℃、5%CO₂の環境下で1時間培養した。培養1時間後ディッシュをCa²⁺/Mg²⁺不含ダルベッコ変法リン酸緩衝液(D-PBS

(一))で洗浄して浮遊細胞を除去、底面に付着した線維芽細胞のみを培養した。

【0025】胎仔線維芽細胞を支持細胞層として使用するためマイトマイシンC処理を行った。線維芽細胞が十分に増殖し単層シートを形成したディッシュに、10ug/mlのマイトマイシンCを含む10%NCS添加DME培養液を分注し、2~3時間、37℃、5%CO₂の環境下に放置した後、D-PBS(一)で3回洗浄、次にトリプシン-EDTA処理により細胞を分散した。分散した細胞を遠心により沈澱回収後、10%NCS添加DME培養液に再浮遊し、この細胞浮遊液を6穴プレートの各ウェルに分注して支持細胞層とした。

【0026】実施例3:

ESM/NRによるWistar系ES細胞株の樹立

Wistar系ラット同士を交配し、交配確認翌日をday1としてday4に子宮灌流によって脱出胚盤胞を

表4: ESM/NRによるACI系ラットES細胞の樹立

胚盤胞数	分離ICM数	樹立ES細胞株系統数	樹立ES細胞クローン数
6	4	4	16

【0029】実施例5:

ESM/NRによるラットES細胞の維持及び増殖

ESM/NR2及びESM/NR2からnrIGF-IIを除いたESM/NR2 I⁽⁻⁾を使用し、それぞれ6穴

得た(図1)。脱出胚盤胞を上記の支持細胞層上でESM/NR1を用いて培養することにより、培養開始後3~4日目に全ての胚盤胞においてICMの増殖が観察され(図2)、増殖したICMをマイクロピペットで分離して新たな支持細胞層上に移した(図3)。分離ICM以降の培養にはESM/NR2を使用し、未分化形態を示すコロニーを1~3回クローニングすることにより未分化形態を示す細胞のみからなる細胞集団を得た(図4)。

【0027】実施例4:

ESM/NRによるACI系ES細胞株の樹立

上記Wistar系ラットの場合と同様に、ACI系ラット同士を交配し、交配確認翌日をday1としてday4に子宮灌流によって胚盤胞を得た。胚盤胞を上記の支持細胞層上でESM/NR1を用いて培養することにより、培養開始後3~4日目に全ての胚盤胞においてICMの増殖が観察され、増殖したICMをマイクロピペットで分離して新たな支持細胞層上に移した。分離ICM以降の培養にはESM/NR2を使用し、未分化形態を示すコロニーを1~3回クローニングすることにより未分化形態を示す細胞のみからなる細胞集団を得た。ESM/NRを使用したACI系ES細胞株の樹立結果を表4に示す。

【0028】

【表4】

プレートに作製した支持細胞層上でACI系ES細胞を培養した。培養2日目においてESM/NR2を使用した培養ではES細胞は未分化形態を保持したまま増殖したが(図5)、ESM/NR2 I⁽⁻⁾を使用した培養で

は大部分の細胞が分化した(図6)。以上の比較培養の結果から、ES細胞の維持・増殖にはIGF-IIが不可欠であることが判明した。

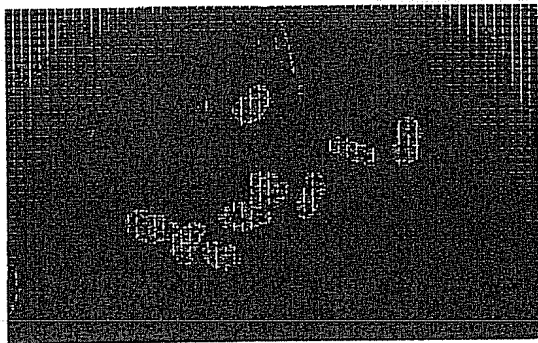
【0030】実施例6:

ラットES細胞の分化誘導培養

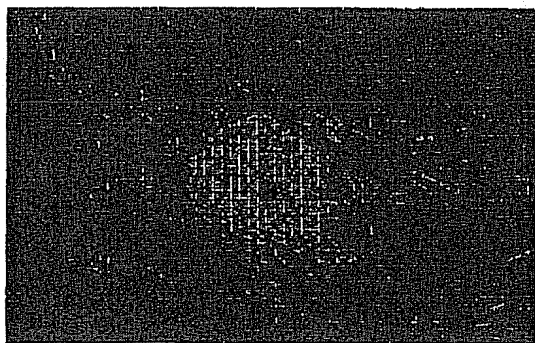
ESM/NRで樹立したWistar系ES細胞を浮遊培養することにより、分化能保持の指標となる胚様体(embryoid body)の形成について検討した。

【0031】未分化コロニーが十分に増殖しているwe 10 11をトリプシン-EDTA処理により支持細胞層と共に消化・分散し、さらに遠心によって細胞を沈澱・回収、10%NC S添加DME培養液に再浮遊した。細胞浮遊液をプラスチックディッシュに分注し、37℃、5%CO₂の環境下で1時間培養し、次にディッシュをD-PBS(一)で洗浄、非付着細胞のみを回収した。洗浄液を遠心して浮遊細胞を沈澱・回収、10%NC S添加DME培養液に再浮遊、この細胞浮遊液を浮遊培養用ディッシュに分注することにより、ES細胞のみを浮遊培養した。

【図1】



【図3】



【0032】以上の操作により、Wistar系ES細胞を浮遊培養した結果、培養開始後1~2日目に分散していた細胞が凝集し始め、さらに5~7日目には球形で内部が中空の胚様体へと分化した(図7)。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、Wistar系ラットより採取した脱出胚盤胞を示す。

【図2】図2は、支持細胞層上で胚盤胞より増殖している内部細胞塊(ICM)を示す。

【図3】図3は、新たな支持細胞層上に移された内部細胞塊(ICM)を示す。

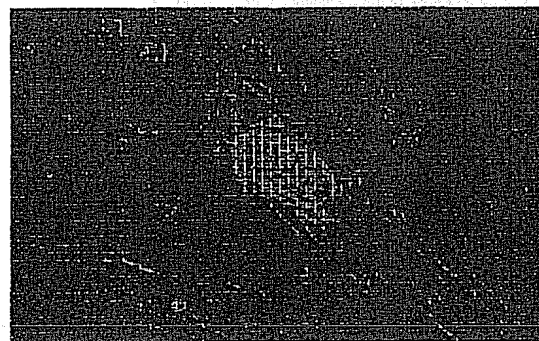
【図4】図4は、コロニークローニングにより得られた未分化形態細胞コロニーを示す。

【図5】図5は、IGF-II添加培養液(ESM/NR 2)により増殖した未分化形態コロニーを示す。

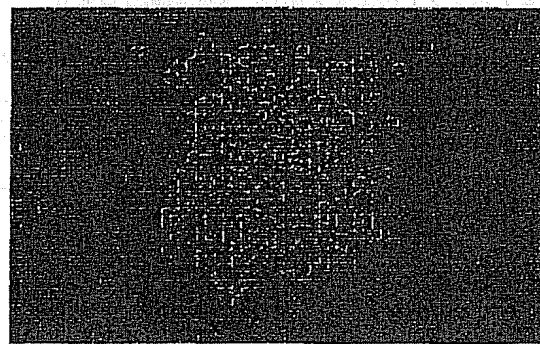
【図6】図6は、IGF-II未添加培養液(ESM/NR 2 I)により出現した分化形態コロニーを示す。

【図7】図7は、浮遊培養により形成された胚様体を示す。

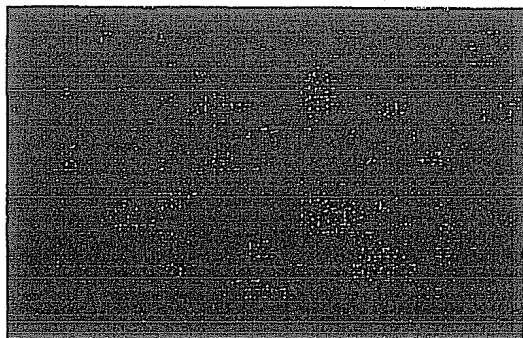
【図2】



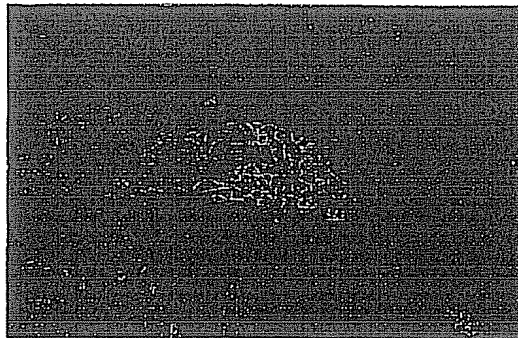
【図4】



【図5】



【図6】



【図7】

